

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WPI Acc No: 91-125835/199118

Liposome(s) contg. fluorescent marker and coupled to antibody - useful as diagnostic reagent and for targetted delivery of therapeutic agent for treating cancer, malaria etc.

Patent Assignee: LANGHALS H (LANG-I)

Inventor: LANGHALS H; SCHOTT H; SCHWENDENE R A

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
DE 3935257	A	19910425	DE 3935257	A	19891023		199118 B

Priority Applications (No Type Date): DE 3935257 A 19891023

Abstract (Basic): DE 3935257 A

Liposomes which contain detectable cpds. (I) and are coupled to antibiotics (Ab) are new.

More specifically Ab are B8-24.3 and B16-6.2 (target cells: E14 and B16-F10) and are covalently coupled to the liposomes by: (1) reaction with N-succinimide-5-acetyl-thioacetate (SATA); (2) treatment with NH₂OH to generate free SH then; and (3) reaction with a maleimido-substd. liposome. Alternatively, Ab are attached through a biotin: avidin interaction. Liposome components are soybean oil phosphatidyl choline (PC); cholesterol; maleinimide deriv. and alpha-tocopherol esp. at ratio 1:0.2:0.02:0.01. (I) are fluorescent dyes of the perylene type. esp. N,N'-bis(1-hexylheptyl)-3,4,9,10-perylene-bis(carboximide) (Ia).

USE/ADVANTAGE - The Ab-contg. liposomes can be targetted to particular sites in the body and provides transport of many (I) (or active ingredient) mol. per Ab mol.. They are useful therapeutically, when loaded with active ingredients (e.g. cytostatics, virustatics or antibiotics), for treating tumours, virus infections, rheumatic disease, bilharzia, malaria etc., and can also be used to treat CNS diseases, using drugs which will not normally cross the blood-brain barrier. The liposomes can also be used diagnostically in a wide variety of tests, e.g. for AIDS, cancer screening or detection of metabolic disorders. In vivo, the transport and concn. of the liposomes can be monitored fluorimetrically or visually. (I) provide very high sensitivity without the dangers associated with radioisotopes; remain firmly embedded in the lipid bilayer during transport; are not toxic; have high photo-stability, fluorescence quantum yield and organic solvent solubility, and fluoresce at 540-575 nm, well away from the background.

Dwg.1a/b

Derwent Class: B02; B04; B07; D16; S03

International Patent Class (Additional): A61K-039/44; C07K-001/04;

C07K-017/02; C12Q-001/00; G01N-033/56

PROCESS

THIS PAGE BLANK (USPTO)

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 **Offenlegungsschrift**
①0 **DE 39 35 257 A 1**

②1 Aktenzeichen: P 39 35 257.9
②2 Anmeldetag: 23. 10. 89
④3 Offenlegungstag: 25. 4. 91

⑤1 Int. Cl. 4:
C 07 K 17/02
C 07 K 1/04
A 61 K 39/44
G 01 N 33/563
C 12 Q 1/00
// (A 61 K 39/44,
31:205)

DE 39 35 257 A 1

⑦1 Anmelder:
Langhals, Heinz, Prof. Dr., 8012 Ottobrunn, DE

⑦2 Erfinder:
Langhals, Heinz, Prof. Dr., 8012 Ottobrunn, DE.
Schott, Herbert, Prof. Dr., 7400 Tübingen, DE.
Schwendener, Reto Albert, Kilchberg, CH

⑤4 Mit Antikörpern verknüpfte Liposomen als Träger für einen gezielten Transport von Wirkstoffen und Reagenzien - Fluoreszenzmarkierung der Transportwege und des Wirkorts

Die Verknüpfung von Antikörpern mit Liposomen, die Fluoreszenzfarbstoffe tragen, wird beschrieben. Hierbei ist von besonderem Vorteil, daß der am meisten bevorzugte Fluoreszenzfarbstoff, N,N'-Bis(1-hexylheptyl)-3,4:9,10-perylenbis(dicarboximid), in die Lipidschicht eingelagert und dadurch eine besondere Stabilität der Kombination Liposom/Fluoreszenzfarbstoff erreicht wird. Durch z. Tl. ausgewählte Antikörper, Liposomen und deren Verknüpfungen werden Systeme erhalten, die sich von Fluoreszenzimmuntests mit hohem Verstärkungsfaktor über diagnostische bis zu therapeutischen Anwendungen einsetzen lassen, wobei bei den letzteren das Liposom außerdem noch zu einem Transportsystem von Wirkstoffen wird.

DE 39 35 257 A 1

Beschreibung

Der gezielte Transport von pharmakologisch wirksamen Substanzen zum eigentlichen Wirkort ist ein ungelöstes Problem. Während man bei einer großen Anzahl von wirksamen Substanzen eine Verteilung über den ganzen Körper inkaufnehmen kann, ist dies beispielsweise bei Cytostatika und anderen Wirkstoffen mit einer geringen therapeutischen Breite höchst unerwünscht. Gerade bei den meist unspezifisch stark toxisch wirkenden Cancerostatika bräuchte eine Freisetzung erst am Zielort einen wesentlichen Fortschritt in der Therapie. Ein attraktiver Weg, dieses Problem zu lösen, ist die Ausnutzung der Antigen-Antikörper-Reaktion, die die gewünschte Spezifität besitzt. Man könnte nun daran denken, den Antikörper kovalent mit dem Wirkstoff zu verknüpfen. Dies hat aber den Nachteil, daß dadurch die Wirksamkeit des Wirkstoffs oder die Spezifität des Antikörpers beeinflußt werden können — man kann zudem nur wenige Wirkstoffmoleküle mit einem Antikörper transportieren. Außerdem müßte für jeden Wirkstoff ein neues Synthesekonzept für die Verknüpfung entworfen werden. Dies macht das Verfahren umständlich, schwerfällig und synthetisch aufwendig. Wünschenswert wäre ein universelles Trägersystem, dessen Funktion und Transport sich möglichst einfach verfolgen läßt und das viele Wirkstoff- und Markierungs- bzw. Detektions-Moleküle pro Antikörper transportieren kann.

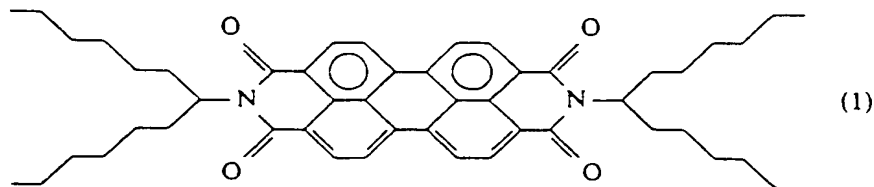
Zum Erstaunen läßt sich dies mit Liposomen erreichen, die mit dem entsprechenden Antikörper verknüpft werden. Der Hohlraum der Liposomen, sowie die Lipidmembranen können sehr unterschiedliche Wirkstoffe aufnehmen, die dann am Zielort aktiv werden.

An Liposomen werden Antikörper immobilisiert. Die Immobilisierung ist sowohl über kovalente Bindungen als auch über Nebenvalenzkräfte möglich. Für die kovalente Immobilisierung eignet sich die direkte Kondensation zwischen funktionalisierten Liposomen und Antikörpern unter Zuhilfenahme an und für sich bekannter Kondensationsmittel. Für die kovalente Immobilisierung eignet sich besonders N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) und N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat (SATA), das etwas bessere Kupplungsergebnisse liefert (J.T.P.Derksen, G.L.Scherphof, Biochim.Biophys.Acta 814 (1985) 151). Für die eigentliche Kupplung wird die Reaktionsfolge nach Abb.1 ausgeführt.

Für die Immobilisierung über Nebenvalenzkräfte eignet sich besonders die Biotin-Avidin-Komplexierung (H.Schott, B.Leitner, R.A.Schwendner, H.Hengartner, J.Chromatogr. 441 (1988) 115). Die Kupplung wird nach der Reaktionsfolge der Abb. 1c durchgeführt. Wesentlich für die Anwendung der mit Wirkstoffen beladenen und mit Antikörpern versehenen Liposomen ist die Möglichkeit, ihren Transport und das Binden an den Zielort verfolgen zu können. Bei in-vitro-Versuchen besteht zwar grundsätzlich die Möglichkeit, dies mit einer radioaktiven Markierung zu erreichen, die die erforderliche Nachweisempfindlichkeit liefert. Hier ist aber bereits der Umgang mit radioaktiven Stoffen störend, da er besondere Vorsichtsmaßnahmen erfordert. Bei klinischen Anwendungen sollte man dagegen nach Möglichkeit auf jegliche radioaktiven Stoffe verzichten. Günstiger ist es daher, die Liposomen mit einer Markierung zu versehen, die unproblematisch und ungefährlich mit optischen Methoden nachgewiesen werden kann. Die Liposomen können hierfür mit einem Farbstoff versehen werden. Eine quantitative Bestimmung des Farbstoffs über seine Lichtabsorption erweist sich aber als schwierig und störanfällig, da eine Absorptionsmessung eine optische Qualität der Probe voraussetzt. Dies ist bereits bei der Liposom-Antikörper-Kombination wegen deren Größe nicht gegeben. Bei gebundenen Antikörpern werden die Unsicherheiten noch erheblich größer.

Einen erstaunlichen Fortschritt bringt die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen als optische Markierer. Die Probe wird durch die optische Anregung nun selbst zur Lichtquelle, die problemlos auf einen optischen Empfänger fokussiert werden kann. Außerdem bietet die Fluoreszenz den Vorteil einer sehr hohen Nachweisempfindlichkeit, da gegenüber dem nichtfluoreszierenden Hintergrund gemessen wird.

Für den Fluoreszenzfarbstoff sind jedoch einige Randbedingungen zu beachten: Da biologische Proben selbst leicht bläulich fluoreszieren, sollte die Fluoreszenz des Farbstoffs außerhalb dieses Wellenlängenbereichs liegen, also genügend langwellig sein. Zum Erreichen einer hohen Nachweisempfindlichkeit wird man ein Anregungslicht mit hoher Intensität verwenden. Der Fluoreszenzfarbstoff muß daher eine hohe Photostabilität besitzen, um nicht während der Messung auszubleichen. Schließlich sollte der Farbstoff nicht toxisch sein. Eine besonders wichtige Eigenschaft ist ein festes Haftvermögen an den Liposomen, denn während des Transports darf der Farbstoff nicht freigesetzt werden. Andererseits darf der Farbstoff nicht an den Antikörper selbst binden, da dadurch möglicherweise seine Spezifität und sein Bindungsvermögen nachteilig beeinflußt wird. Schließlich darf der Farbstoff auch die Adsorptionseigenschaften der Liposomen nicht verändern.



Diese Bedingungen werden in überraschend guter Weise vom Perylenfarbstoff 1 erfüllt (N,N'-Bis(1-hexylheptyl)-3,4 : 9,10-perylenbis(dicarboximid), für die Synthese siehe S.Demmig, H.Langhals, Chem.Ber. 121 (1988) 225), der die Eigenschaften hohe Photostabilität, große Fluoreszenzquantenausbeute (100%), gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln (lipophile Medien) und langwellige Fluoreszenz (540 und 575 nm) in sich vereinigt. Außerdem sind von der Klasse der Perylenfarbstoffe keinerlei toxische Wirkungen bekannt, obwohl sie schon sehr lange Zeit (ab 1909) technisch verwendet wird.

Unerwartet fest ist der Einbau von Farbstoff 1 in die Liposomen — es wird keinerlei Abgabe des Farbstoffs

unter physiologischen Bedingungen aus den Liposomen beobachtet —, so daß der Farbstoff alle geforderten Bedingungen erfüllt. Eine mögliche Erklärung für die feste Bindung in der Lipidschicht der Liposomen ist darin zu sehen, daß der Farbstoff zum einen sehr hydrophob ist und zum anderen die terminalen Alkylketten wahrscheinlich in optimale Wechselwirkung mit den Alkylketten der Lipidmembran treten können. Hierbei ist noch wichtig, daß der Farbstoff klein genug ist, um nicht aus der Lipiddoppelschicht herauszuragen. Experimentell wird tatsächlich beobachtet, daß durch die eingebauten Farbstoffmoleküle die Absorptionseigenschaften der Liposomen nicht verändert werden.

Die Geschwindigkeit der Kopplung von Antikörpern an Liposomen geht aus Abb. 2 hervor. Der eigentliche Kopplungsvorgang ist im wesentlichen nach weniger als einer Stunde abgeschlossen.

Die Bestimmung der Bindung der Antikörper an Zellen erfolgt Cytofluorimetrisch. Die Empfindlichkeit der Methode geht aus Abb. 3 hervor.

In Abb. 4 ist das Ergebnis eines Konkurrenzversuchs mit freien Antikörpern angegeben. In Abb. 5 sind Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit gebundenen und ungebundenen Liposomen angegeben und in Abb. 6 schließlich elektronenmikroskopische Aufnahmen, die die Rezeptor-gesteuerte Aufnahme eines Liposoms zeigen.

Neben der Möglichkeit, mit dem Fluoreszenzfarbstoff den Transport von Wirkstoffen zu verfolgen kann dieser auch direkt in der Diagnostik eingesetzt werden — dies führt direkt zu einem neuen Fluoreszenzimmunoassay mit einer ungewöhnlich hohen Empfindlichkeit, insbesondere bei Antikörpern auf Zellen. Dies läßt sich im Vergleich mit den bestehenden Methoden wie folgt erklären: Zellspezifische monoklonale Antikörper sind gegenüber einer Derivatisierung sehr empfindlich. Sie können daher manchmal nicht und wenn, dann nur mit wenigen Markermolekülen (z. B. Fluoreszenzfarbstoffe) derivatisiert werden. Üblicherweise wird als Ausweg ein zweiter, unempfindlicher Antikörper, der auf den ersten spezifisch ist, eingesetzt, der dann mit mehr Markermolekülen beladen werden kann. Hierdurch wird ein notwendiger Verstärkungsfaktor in der Empfindlichkeit erreicht. Dieser ist jedoch stark begrenzt, da auch der zweite Antikörper in der Regel nur mit weniger als 10 Markermolekülen beladen werden kann. Einen ganz wesentlichen Fortschritt bringt hier der Einsatz von Antikörper-Liposomen, die ohne Probleme 10 000 und viel mehr Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle aufnehmen können. Dadurch wird ein ungewöhnlich großer Verstärkungsfaktor erreicht. Darüber hinaus kann ein Liposom im allgem. direkt an den zellspezifischen monoklonalen Antikörper gebunden werden, ohne ihn zu beeinträchtigen. Dadurch vereinfacht sich ein Fluoreszenzimmunnachweis ganz beträchtlich und weist gleichzeitig den hohen Verstärkungsfaktor auf. Die mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Liposomen können aber auch an den genannten zweiten (sekundären) Antikörper gebunden werden. Es wird dann ebenfalls der große Verstärkungsfaktor erzielt und außerdem besitzen dann die Liposom-Antikörper-Einheiten eine größere Robustheit.

Schließlich können die Fluoreszenzfarbstoffe in den Antikörper-gebundenen Liposomen direkt zur Therapie eingesetzt werden. Hierbei läßt sich ausnutzen, daß photochemisch Elektronenübertragungsreaktionen bei Farbstoffen ausgelöst werden können. Die Farbstoffe werden zum Wirkort, z. B. eine Geschwulst, transportiert und binden durch den Antikörper. Der Farbstoff selbst ist dabei zunächst nicht toxisch. Durch Licht kann nun lokal und zudem gezielt durch die Antikörper plziert, eine chemische Reaktion ausgelöst werden, mit der der Zielort beeinflußt wird.

Besonders wichtig ist eine Behandlung mit dem genannten Antikörper-Liposomen-System, mit Wirkstoff und mit Fluoreszenzfarbstoff- oder nur mit Fluoreszenzfarbstoff-beladen, in den Fällen, in denen ein operativer Eingriff nicht erfolgreich ist. Hier wären folgende Erkrankungen als Beispiel zu nennen:

- Metastasen von bösartigen Geschwülsten
- Geschwülste, bei denen ein operativer Eingriff lebensgefährlich oder unmöglich ist (z. B. bei Gehirntumoren)
- Virusinfektionen
- Behandlung chronischer, lokaler Entzündungen (rheumatische Erkrankungen)
- allgemeiner Befall von Parasiten (Filarien, Billhaziose, Malaria, Trypanosomen, Leberegel oder dergl.)

EXPERIMENTELLER TEIL

N⁶-(6-maleimidocapronyl-N²-palmitoyl-L-lysinmethylester (EMC-PL)

950 mg (4.5 mmol) 6-Maleimidocapronsäure werden in 4 ml wasserfreiem Methylenchlorid gelöst und mit N-Methylmorpholin auf pH 7–8 gebracht (Glaselektrode). Es werden 1.02 g (4.95 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben, 10 min gerührt, und dann wird mit 6 g (4.5 mmol) N²-Palmitoyl-L-lysinmethylester-Hydrochlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit 10 ml Methylenchlorid gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 20 ml Methylenchlorid gelöst und über eine Kieselgel-Säule (21.5 × 5 cm) chromatographiert. Die Säule wird mit 2.5 l Methylenchlorid, 2.5 l Methylenchlorid/Methanol (97 : 3 v/v), 2.5 l Methylenchlorid/Methanol (95 : 5 v/v) und, 2 l Methylenchlorid/Methanol (90 : 10 v/v) eluiert. Das letzte Eluat wird eingedampft und ergibt ein Produkt, das keine Reaktion mit Ninhydrin und Bromkresolgrün zeigt. Die Palmitoylgruppe läßt sich mit 2,7-Dichlorfluorescein und die Amidgruppe mit Chlortoluidin nachweisen.

Ausb. 1.7 g (67%)

R_F(Kieselgel-CH₂Cl₂/Methanol 95 : 5 v/v) = 0.7.

MS (70 eV): m/z (%) = 592.

$C_{33}H_{57}N_3O_6$ (591)

Ber. C 66,97, H 9,71, N 7,10;

Gef. C 66,54, H 10,28, N 7,42.

- 5 Auf völlig analogem Wege wird das lipophile Maleimidderivat N^6 -(3-Maleimido-propionyl- N^2 -palmitoyl-L-lysin-methylester (MP-PL) synthetisiert.

Darstellung von N^4 -Oleyl-ara-C-Liposomen mit verschiedenen philen Maleimidderivaten

- 10 Kleine unilamellare Liposomen werden durch Detergenzdialyse entsprechend Literaturangaben (W.Rubas, A.Supersaxo, H.G.Weder, H.R.Hartmann, H.Hengartner, H.Schott, R.A.Schwendner, Int.J.Cancer 37 (1986) 149) hergestellt. Das Matrix-Lipidmaterial ist dabei bei allen Versuchen Sojabohnenöl-phosphatidylcholin (SPC) : Cholesterol : DL- α -Tocopherol wie 1 : 0,2 : 0,01 Molteile mit 20 mg SPC/ml (26 μ mol/ml) Anfangskonzentration an Lipiden. Die Maleimidderivate MP-PL, EMC-PL werden in 0,02 und N^4 -Oleyl-ara-C (NOAC, N^4 -Oleyl-cytosin-arabinosid) in 0,2 Molteilen zugegeben. Der lipophile Fluoreszenzmarker BHPD (N,N'-Bis(1-hexylheptyl)-3,4 : 9,10-perylenbis(dicarboximid) — Farbstoff 1) wird in 0,006 Mol-Teilen in die Liposomen eingebracht.

- Alle Lipide einschließlich des entsprechenden Spacers und NOAC und BHPD werden in Methanol/Chloroform (1 : 1 v/v) gelöst. Natriumcholat wird in einem Molverhältnis von 0,6 bis 0,7 in Vergleich zur Summe der Konzentrationen aller Membran-bildenden Lipide zugesetzt.

- 20 Nach Entfernen der organischen Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (40°C, 60 min) wird die Lipid-Detergenz-Mischung mit einem Phosphatpuffer (67 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat/67 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4) solubilisiert. Die Micell-Lösung (10–20 ml) wird gegen 5–10 l des gleichen Puffers bei 40°C 2 h und dann bei 25°C 24 bis 36 h dialysiert. Die Liposomen werden dann durch einen 0,45 μ m Sterilfilter (Sartorius) filtriert. Die Liposomen werden bei 4°C gelagert. Ihre Größe wird durch Lichtstreuung und Elektronenmikroskopie nach bekannten Methoden bestimmt.

Bestimmung der Liposomen-Konzentration durch BHPD-Fluoreszenz

- 30 Der Fluoreszenzfarbstoff BHPD (Farbstoff 1) wird zur Konzentrationsbestimmung der Liposomen durch Cytofluorometrie verwendet. Insbesondere kleine BHPD-Konzentrationen (unter 4×10^{-7} M) werden mit einem SPF-500 Aminco Spektrofluorometer bei 489 nm Anregung und 533nm Emission gemessen. Verdünnungsreihen von Micellen oder Liposomen mit bekannter Lipid- und BHPD-Konzentrationen werden dabei als Standards verwendet.

- 35 Zur Kontrolle der Stabilität der BHPD-Inkorporation in die Liposomenmembran wird 0,5 ml Liposomen-Anteil gegen 200 ml 67 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 4°C über 30 Tage dialysiert. Die BHPD-Konzentration wird in Intervallen von 48 h bestimmt. Zusätzlich läßt sich die Lipid-Konzentration des Dialysats durch Szintillationszählung von 3 H-radioaktiv markierten Lipiden kontrollieren und läßt damit evt. auftretende Volumenänderungen erkennen.

40

Antikörper

- Die monoklonalen Antikörper B8-24.3 (Maus IgG2b, MHC Klasse I, anti H-2k^b) wurden aus Ascites-Flüssigkeit von Balb/c-Mäusen nach bekannten Verfahren gewonnen. Die Antikörper werden mit 40% Ammoniumsulfat gefällt und mit HPLC auf Hydroxyapatitsäulen (100 \times 7,8mm, BioGel HPHT, BioRad) weiter gereinigt, wobei ein Phosphat-Puffergradient (10–300 mM, pH 6,8) mit einem Fluß von 0,5 ml/min verwendet wird.

Der anti B16 Melanom Antikörper (Ratt IgG2a) wurde, in gefriergetrockneter Form erhalten und entsprechend der Literatur ohne weitere Reinigung eingesetzt.

50

Antikörper-Liposom-Kupplung mit SPDP

Derivatisierung der Antikörper mit SPDP

- 55 SPDP wird mit den Antikörpern nach einem abgewandelten Verfahren der von Carlsson (J.Carlsson, H.Drevin, R.Axen, Biochem.J. 173 (1978) 723) beschriebenen Methode verbunden. Hierfür wird zu 10–40 mg/ml Antikörper in 0,1 M Phosphatpuffer / 0,1 M Kochsalz (pH 7,5) langsam bei Raumtemperatur eine Lösung von 150 mM SPDP gegeben, bis das Verhältnis von Antikörper zu SPDP 1 : 24, 1 : 12 oder 1 : 6 beträgt — Reaktionsdauer 60 min. Zum Entfernen von nicht umgesetzten SPDP wird der Ansatz 24 h bei 4°C gegen das 1000 fache Volumen Phosphatpuffer dialysiert. Die dialysierten Antikörper (Ab-PDP) werden bei 4°C gelagert. Die Anteile von gebundenen SPDP-Molekülen werden nach Reduktion der Disulfidbrücken mit 100 mM Dithiothreitol durch Absorptionsmessung von 2-Thiopyridon bei 343 nm bestimmt.

Reduktion von Antikörper-PDP und Kopplung an Maleimid-Liposomen

- 65 Die Ab-PDP Lösungen werden gegen Acetatpuffer (0,1 M Natriumacetat/0,1 M Essigsäure und 0,1 M Kochsalz (pH 4,5)) bei 4°C 24 h dialysiert. Dithiothreitol wird zugegeben, bis eine Konzentration von 25 mM erreicht wird. Nach 60 min Inkubationszeit bei 25°C wird die Mischung bei Raumtemperatur an einer Sephadex G 50 Säule (30 \times 1 cm) mit 67 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) chromatographiert. Mit einem Fluß von 0,5 bis 1 ml/min

wird der aktivierte Antikörper von Dithiotreitol und 2-Thiopyridon getrennt. Fraktionen des Eluats werden gesammelt und bei 280 nm (LKB Ultrarac, Uvicord S) untersucht.

Die Kupplung an Maleimid-Liposomen wird direkt nach der Säulentrennung des aktivierten Antikörpers durchgeführt. Molare Verhältnisse von Ab-P-SH zu Liposomen-Maleimid von 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 40 werden dabei verwendet. Die Antikörper-Konzentrationen variieren zwischen 0.15 und 0.6 mg/ml, und die Lipid-Konzentration beträgt 1 bis 5 mg SPC/ml. Die Kupplungsreaktion wird bei 25°C unter Stickstoff und gelegentlichem gelinden Rühren in Volumina von 2 bis 12 ml entsprechend den Eduktverhältnissen ausgeführt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von N-Ethylmaleimid gestoppt, das die freien Thiogruppen absättigt. N-Ethylmaleimid wird hierfür in einem minimalen Volumen von 67 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) gelöst und in 24fachem Überschuß, bezogen auf die Antikörper-Konzentration, zur Reaktionsmischung gegeben.

Antikörper-Liposom-Kupplung unter Verwendung von SATA

Derivatisierung der Antikörper mit SATA

Die Antikörper-Derivatisierung mit SATA wird nach Literaturangaben (J.T.P.Derksen, G.L.Scherphof, Biochim.Biophys.Acta 814 (1985) 151 und R.J.S.Duncan, P.D.Weston, R.Wrigglesworth, Anal.Biochem. 132 (1983) 88) vorgenommen. Die Antikörper werden in 50 mM Phosphatpuffer/1 mM EDTA (pH 7.5) bei einer Konzentration von 4 bis 10 mg/ml (0.25 bis 1×10^{-9} M) gelöst und 60 min bei 25°C unter Stickstoff-Schutzatmosphäre und gelindem Rühren mit 150 mM SATA zur Reaktion gebracht, das im minimalen Volumen DMF gelöst wird. Die molaren Verhältnisse Antikörper zu SATA sind 1 : 24, 1 : 12 und 1 : 6. Nicht umgesetztes SATA wird durch 24 h Dialyse bei 4°C gegen das 1000fache Volumen des gleichen Puffers entfernt. Die SATA-gekoppelten Antikörperlösungen (Ab-ATA) werden bei 4°C gelagert.

Zur Bestimmung der Menge des Antikörper-gekoppelten SATA wird die Acetyl-Schutzgruppe mit Hydroxylamin entfernt. Die Bestimmung der freien Sulfhydrylgruppe erfolgt mit Ellman's Reagenz, wie oben beschrieben.

Deacetylierung von Ab-ATA und Kupplung mit Maleimid-Liposomen

1 ml der Ab-ATA-Lösung wird durch Zugabe von 1 ml Hydroxylaminhydrochloridlösung (0.5 M in 50 mM Phosphatpuffer/25 mM EDTA (pH 7.5)) während 1h Reaktionszeit bei 25°C unter Stickstoff und gelindem Rühren deacetyliert. Danach werden die aktivierten Antikörper (Ab-A-SH) sofort bei pH 6 an Maleimid-Liposomen gekuppelt. Das molare Verhältnis Antikörper zu Liposom beträgt dabei 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 40 bei einer Ab-A-SH-Konzentration von 0.3mg/ml. Die Reaktion wird nach einer Inkubationszeit bei 25°C von 0.2 bis 20 h durch die Zugabe von N-Ethylmaleimid in einem molaren Verhältnis von 1 : 24 gestoppt.

Trennung der Immunoliposomen von freien Antikörpern

Freie Antikörper werden von den Immunoliposomen nach zwei Methoden getrennt:

1. Trennung mit HPLC mit einer Trennsäule BioGel TSK 40 (300 x 7.5 mm) und einem Fluß von 0.75 ml/min 67 mM Phosphatpuffer (pH 7.4). Dabei wird die Elution der Liposomen über die Absorption von incorporiertem BHPD bei 522 nm verfolgt. Freie Antikörper und Immunoliposomen werden getrennt gesammelt und aufgearbeitet.
2. Die zweite Methode wird zur Trennung größerer Volumina (5 bis 10 ml) verwendet. Ungekuppelte, aktivierte Antikörper werden hierbei von den Immunoliposomen durch Flotation in einem diskontinuierlichen Metrizamid-Gradienten getrennt (D.Rickwood, G.D.Birnie, FEBS Lett. 50 (1975) 102). Hierfür wird in einem 5 ml Nitrocellulose-Zentrifugenglas (Beckmann, Ultraclear) die Immunoliposom-Lösung mit 60% Metrizamid gemischt, bis eine Konzentration von 20% Metrizamid erreicht wird. Diese wird mit 2 ml 10% Metrizamid überschichtet, gefolgt von 0.5 ml 67 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) als Deckschicht. Der Dichtegradient wird 12 bis 16 h bei 95000 x g bei 4°C zentrifugiert (L8-9M Ultrazentrifuge von Beckmann). Die Immunoliposomen sind dann als gelborange fluoreszierender Ring sichtbar, der vorsichtig isoliert und zweimal gegen 400 ml 67 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) dialysiert wird, um reversibel gebundenes Metrizamid zu entfernen.

Bindungs-Experimente

Immunfluoreszenz und Cytofluorometrische Analyse:

Die Bindungsaktivitäten von unbehandelten und aktivierten Antikörpern (Ab-P-SH, Ab-A-SH) können routinemäßig in vitro überprüft werden. Antikörper-Zell-Bindung wird durch Immunfluoreszenz in Anlehnung an Literaturmethoden (N.Berinstein, K.Matthay, D.Papahadjopoulos, R.Levy, B.I.Sikic, Cancer Res. 47 (1987) 5954) bestimmt. Hierbei werden Ziegen-anti-Maus FITC-IgG (Tago, Burlingame, CA, USA) für die Markierung von B8-24.3 und Ziegenanti-Ratte FITC-IgG (EY Laboratories, San Mateo, Ca, USA) für B16-6.2, beziehungsweise für Second-Antikörper-Labeling verwendet.

Spezifische Immunoliposom-Zell-Bindung wird durch Cytofluorimetrische Analyse bestimmt. Hierbei wird die Fluoreszenz des in die Membran eingebauten photostabilen BHPD genutzt.

Ziel-Zellen (1.5×10^6) werden in IMDM suspendiert und mit 4×10^{12} (0.025nM) Immunoliposomen (entsprechend 2.5×10^6 Liposomen pro Zelle) in Reagenzgläsern bei einem Volumen von 300 bis 400 µl 60 min bei 4°C

umgesetzt. Die Zellen werden dann dreimal mit je 1 ml 67 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) gewaschen, der 1% Rinder-Serumalbumin und 0.02% Natriumazid enthält. Dann werden die Zellen in 0.5 bis 1 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Die Zell-gebundene BHPD-Fluoreszenz wird dann z. B. mit einem Epics Profile Fluoro Cytometer (Coulter Corp.) bei 470 nm Anregung und 530 nm Emissionswellenlänge gemessen.

- 5 Die Bindung von BHPD-markierten Liposomen wird durch die Fluoreszenzmessung in einem festen Intensitätsfenster bestimmt, das individuell für EL4- und B16-Zellen festgelegt wird. Dieses Fenster ist so gesetzt, daß eine natürliche Fluoreszenz der Zellen und die Fluoreszenz von unspezifisch gebundenen Liposomen ausgeschlossen wird (siehe Abb. 3).

10

Bezugszeichenliste :

Abb. 1: Reaktionsfolgen zur Kupplung der Antikörper mit den Liposomen — a) SPDP — b) SATA — (Ab.: Antikörper, DTT: Dithiotreitol) — c) Kupplung über Biotin-Avidin-Komplexierung: separat werden Antikörper und mit Wirkstoffen und/oder mit Fluoreszenzfarbstoffen beladene Liposomen mit Biotin versehen. Im nächsten Schritt werden die Biotin-Reste der Liposomen mit Avidin komplexiert und schließlich die Biotin-tragenden Antikörper an die freie Bindungsstelle des immobilisierten Avidins gebunden.

Abb. 2: a) Kupplung von SPDP modifizierten B8-24.3 Antikörpern an MP-PL Liposomen bei molaren Verhältnissen SPDP zu Antikörper 1 : 12 (●) und 1 : 24 (▲) bei einem molaren Verhältnis von 1 : 40 von Antikörper zu Maleinimid-Gruppen auf der Liposomen-Oberfläche. Anfangskonzentration an Antikörper ist $2 \cdot 10^{-8}$ (100%). Reaktion bei Raumtemperatur unter Stickstoff und pH 6.0. — b) Kupplung von SATA modifizierten B8-24.3 Antikörpern an MP-PL Liposomen unter gleichen Bedingungen wie bei a). Molare Verhältnisse SATA zu Antikörper 1 : 6 (◆), 1 : 12 (●) und 1 : 24 (▲).

Abb. 3: Cytofluorimetrisch bestimmte Bindung von Liposomen an Zellen über die Fluoreszenz von B16-F10-Zellen. a) Selbstfluoreszenz der Zellen. — b) unspezifische Bindung von MP-PL-Liposomen (Kontrollversuch). — c) spezifische Bindung von B16-6.2 modifizierten Liposomen. Der waagerechte Strich gibt das Fenster für die spezifische Ab-Liposomenbindung an. Ähnliche Ergebnisse werden bei Messungen von B8-24.3 modifizierten Liposomen gegenüber EL4-Zellen erhalten.

Abb. 4: Freier Antikörper wurde 60 min bei 4°C umgesetzt. Es wurde mit den Zellen inkubiert, dann drei mal mit 67 mM Phosphatpuffer (pH 7.4), der 1% Rinder-Serumalbumin und 0.02% Natriumazid gewaschen. Danach wurden so viel Liposomen (2.5×10^6 Vesikel pro Zelle) zugegeben bis das Incubationsvolumen von 360 µl erreicht war. Zellgebundene BHPD-Fluoreszenz wurde nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 4°C bestimmt. a) Liposomen-Bindungskonkurrenz mit 0.1 nM freiem B8-24.3 Antikörper an EL4-Zellen (●) und unspezifische Bindung von Liposomen (◇). — b) 0.025 nM B16-6.2 Antikörper und MP-PL Liposomen an B16-F10-Zellen () und unspezifische Bindung von Liposomen (◇).

Abb. 5: a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von EL4-Zellen. 1.6 µm Markierung. — b) Oberfläche-detail von EL4-Zellen, die mit Antikörper-freien Kontroll-Liposomen behandelt wurden 64 000fache Vergrößerung, Markierung 0.3 µm. Die Pfeile bezeichnen einzelne adsorbierte Liposomen und Liposomen-Aggregate. — c) spezifisch gebundene B8-24.3-Liposomen mit einzelnen Liposomen hauptsächlich an die Zellmikrovilli gebunden (Pfeil, 64 000 fache Vergrößerung und 0.3 µm Markierung).

Abb. 6: a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EL4-Zellschnitts, mit B8-24.3-Liposomen behandelt worden ist. An die Zellmembran gebundenen Liposomen sind mit Pfeilen markiert (7 600 ×, Markierung 2.5 µm). — b) Der Ausschnitt der EL4-Zelle zeigt ein einzelnes Liposom, das an die Zellmembran adsorbiert ist (230 000 ×, Markierung 0.09 µm). — c) Rezeptor gesteuerter Zell-Eintritt eines einzelnen Liposoms (100800 ×, Markierung 0.2 µm).

Patentansprüche

50

1. Kupplung von Antikörpern an Liposomen, die Detektions-Verbindungen enthalten. Bevorzugte Antikörper sind B8-24.3- und B16-6.2-Antikörper (für EL4- und B16-F10-Zielzellen). Bevorzugte kovalente Kupplungsreagenzien sind N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) und N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat (SATA). Am meisten bevorzugt wird als Kupplungsreagenz SATA. Bevorzugte Nebenvaleanz-Kupplung ist die Biotin-Avidin Komplexierung. Bevorzugte Liposomenbestandteile sind Sojabohnenöl-Phosphatidylcholin, Cholesterol, Maleinimiderivate und α-Tocopherol, bevorzugt im Verhältnis (0.2—3) : (0.05—0.5) : (0.005—0.1) : (0.001—0.1) am meisten bevorzugt 1 : 0.2 : 0.02 : 0.01. Als Detektions-Verbindungen werden Farbstoffe bevorzugt. Stärker bevorzugt werden Fluoreszenzfarbstoffe, noch stärker bevorzugt werden Perylen-Fluoreszenzfarbstoffe, am meisten bevorzugt wird N,N'-Bis(1-hexylheptyl)-3,4 : 9,10-perylenbis(dicarboximid) — Farbstoff 1 (BHPD).
2. Einlagerung von Detektions-Molekülen in die Lipid-Doppelschicht der Liposomen nach Anspruch 1, die Antikörper tragen, bevorzugt sind lipophile Farbstoffe, stärker bevorzugt sind Fluoreszenzfarbstoffe, noch stärker bevorzugt werden Perylenfarbstoffe, am meisten bevorzugt wird Farbstoff 1.
3. Der gezielte Einsatz von Antikörper tragenden Liposomen nach Anspruch 1 und 2 in der medizinischen Therapie, in der medizinischen Diagnostik und in der Biochemie und der Biologie für vielerlei Tests, bevorzugt Immun-Tests wie z. B. AIDS-Tests, Krebsvorsorgeuntersuchungen, Diagnose von Stoffwechselerkrankungen.
4. Der gezielte Einsatz von Antikörper tragenden Liposomen nach Anspruch 1 und 2 in der medizinischen

65

Therapie, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen mit Wirkstoffen beladen werden, die an einer bestimmten Stelle im Organismus aktiv werden sollen. Bevorzugt sind Wirkstoffe mit einer geringen therapeutischen Breite. Als bevorzugte Beispiele für solche Wirkstoffe seien Cytostatika, Virostatika und Antibiotika genannt. Ein bevorzugtes Beispiel für ein Cytostatikum sei N⁴-Oleoyl-cytosin-arabino- 5
 se genannt. Ein typischer Einsatz für die Antikörper-tragenden Liposomen sind Erkrankungen wie Krebs, insbesondere dann, wenn bereits Metastasen vorliegen oder Formen, bei denen eine operative Behandlung sehr risiko-
 reich oder unmöglich ist. Weitere Beispiele sind die Behandlung von Virusinfektionen, lokaler, chronischer Entzündungen wie rheumatische Erkrankungen und die Behandlung eines allgemeinen Parasiten-Befalls wie etwa der Befall mit Filarien, Trypanosomen oder Leberegel oder die Behandlung von Billharziose oder Malaria. 10

5. Die Verwendung der Antikörper-tragenden Liposomen nach Anspruch 1 und 2 zur Behandlung von Erkrankungen des Zentralnervensystems, bei denen wichtig ist, daß der Wirkstoff die Blut-Hirn-Schranke passiert, wobei die Liposomen auch Wirkstoffe durch die Schranke transportieren können, für die sonst die Schranke undurchlässig ist. 10

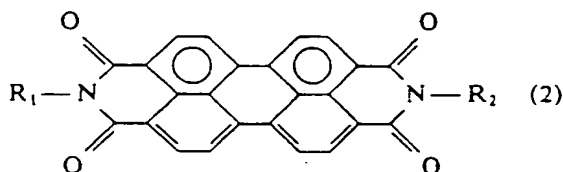
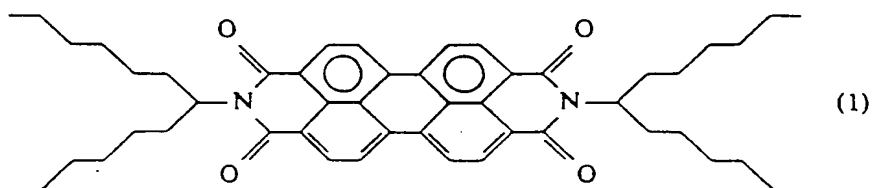
6. Verknüpfung der Liposomen nach Anspruch 1 und 2 mit primären, zellspezifischen Antikörpern. 15

7. Verknüpfung der Liposomen nach Anspruch 1 und 2 mit sekundären Antikörpern, die wiederum mit primären, zellspezifischen Antikörpern wechselwirken. 15

8. Nachweis und quantitative Bestimmung der mit Antikörpern verknüpften Liposomen durch Cytofluorimetrie. — Cytofluorimetrische Bestimmung der Verteilung und des Transports von Liposomen und von Wirkstoffen. 20

9. Fluorimetrische Untersuchung des Transports und der Konzentration der Liposomen in vivo durch fluorimetrische Bestimmung oder visuellen Vergleich. — Fluoreszenz-Kontrolle des Fortschreitens einer Therapie. 20

10. Verwendung von Perylenfarbstoffen der allgemeinen Formel 2 in Antikörper-tragenden Liposomen nach Anspruch 1 oder 2. 25



worin R₁ und R₂ für Wasserstoff, oder Wasserstoff und ein bis vier isocyclische aromatische Reste, dann vorzugsweise mono- bis tetracyclische, insbesondere mono- oder bicyclische Reste, wie Phenyl, Diphenyl oder Naphthyl stehen. Bedeuten R₁ oder R₂ einen heterocyclischen aromatischen Rest, dann vorzugsweise einen mono- bis tricyclischen Rest. Diese Reste können rein heterocyclisch sein oder einen heterocyclischen Ring und einen oder mehrere ankondensierte Benzolringe enthalten. Beispiele von heterocyclischen aromatischen Resten sind Pyridyl, Pyrimidyl, Pyrazinyl, Triazinyl, Furanyl, Pyrrolyl, Thiophenyl, Chinolyl, Isochinolyl, Cumariny, Benzofuranyl, Benzimidazolyl, Benzoxazolyl, Dibenzofuranyl, Benzothiophenyl, Dibenzothiophenyl, Indolyl, Carbazolyl, Pyrazolyl, Imidazolyl, Oxazolyl, Isoxazolyl, Thiazolyl, Indazolyl, Benzthiazolyl, Pyridazinyl, Cinnolyl, Chinazolyl, Chinoxalyl, Phthalazinyl, Phthalazindionyl, Phthalimidyl, Chromonyl, Naphtholactamyl, Benzopyridonyl, ortho-Sulfobenimidyl, Maleinimidyl, Naphtharidinyl, Benzimidazolonyl, Benzoxazolonyl, Benzthiazolonyl, Benzthiazolonyl, Chinazolonyl, Chinazolonyl, Pyrimidyl, Chinoxalonyl, Phthalazonyl, Dioxapyridinyl, Pyridonyl, Isochinolonyl, Isothiazolyl, Benzisoxazolyl, Benzisothiazolyl, Indazolonyl, Acridinyl, Acridonyl, Chinazolindionyl, Benzoxazindionyl, Benzoxazinonyl und Phthalimidyl. Sowohl die isocyclischen wie die heterocyclischen aromatischen Reste können die üblichen nicht wasserlöslich machenden Substituenten aufweisen, wie 50

a) Halogenatome, beispielsweise Chlor, Brom, Jod oder Fluor.

b) Verzweigte oder unverzweigte Alkylgruppen mit vorzugsweise 1 bis 18, insbesondere 1 bis 12, vor allem 1 bis 8 und besonders bevorzugt 1 bis 4 C-Atomen. Diese Alkylgruppen können nicht-wasserlöslich machende Substituenten aufweisen, wie beispielsweise Fluor, Hydroxy, Cyano, —OCOR₃, —OR₄, —OCOOR₃, —CON(R₄)(R₅) oder —OCONHR₃, worin R₃ Alkyl, Aryl wie Naphthyl, oder unsubstituiertes oder durch Halogen, Alkyl, oder —O-Alkyl substituiertes Benzyl oder einen heterocyclischen Rest, R₄ und R₅ Wasserstoff, unsubstituiertes oder durch Cyano oder Hydroxy substituiertes Alkyl, C₃- bis C₂₄- Cycloalkyl, bevorzugt C₅-, C₆-, C₁₂-, C₁₅-, C₁₆-, C₂₀- und C₂₄-Cycloalkyl, Aryl oder Heteroaryl, insbesondere unsubstituiertes oder durch Halogen, Alkyl oder —O-Alkyl substituiertes Phenyl bedeuten, oder worin R₄ und R₅ zusammen mit dem anderen Rest R₂ einen 5-6gliedrigen Ring oder auch Heteroring bilden, wie beispielsweise einen Pyridin-, Pyrrol-, Furan- oder Pyranring. Weitere mögliche 65

Substituenten an den Alkylgruppen sind mono- oder dialkylierte Aminogruppen, Arylreste, wie Naphthyl oder insbesondere unsubstituiertes oder durch Halogen, Alkyl oder —O-Alkyl substituiertes Phenyl, oder ferner heterocyclische aromatische Reste, wie z. B. die 2-Thienyl, 2-Benzoxazolyl-, 2-Benzthiazolyl-, 2-Benzimidazolyl-, 6-Benzimidazolonyl-, 2-, 3- oder 4-Pyridinyl-, 2-, 4-, oder 6-Chinoly- oder 1-, 3-, 4-, 6-, oder 8-Isochinolylreste.

Enthalten die unter b) genannten Substituenten ihrerseits wieder Alkyl, so kann dieses Alkyl verzweigt oder unverzweigt sein und vorzugsweise 1 bis 18, insbesondere 1 bis 12, vor allem 1 bis 8 und besonders bevorzugt 1 bis 4 C-Atome enthalten.

Beispiele von unsubstituierten Alkylgruppen sind Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sec-Butyl, tert-Butyl, tert-Amyl, n-Hexyl, 1,1,3,3-Tetramethylbutyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl, n-Decyl, n-Undecyl, n-Dodecyl, n-Octadecyl, 3-Pentyl, 4-Heptyl, 5-Nonyl, 6-Undecyl, 7-Tridecyl, 3-Hexyl, 3-Heptyl, 3-Nonyl, 3-Undecyl, Hydroxymethyl, 2-Hydroxyethyl, Trifluormethyl, Trifluorethyl, Cyanomethyl, Methoxycarbonylmethyl, Acetoxymethyl oder Benzyl.

c) Die Gruppe —OR₆, worin R₆ Wasserstoff, Alkyl, Aryl, beispielsweise Naphthyl oder insbesondere unsubstituiertes Phenyl, C₃ bis C₂₄-Cycloalkyl, bevorzugt C₅-, C₆-, C₁₂, C₁₅-, C₁₆-, C₂₀-, und C₂₄-Cycloalkyl, Aryl oder Heteroaryl, insbesondere unsubstituiertes oder durch Halogen, Alkyl oder —O-Alkyl substituiertes Phenyl bedeuten. In den Definitionen von R₆ vorkommendes Alkyl kann z. B. eine der unter b) als bevorzugt angegebene Anzahl an C-Atome haben. Als Beispiele von R₆ seien genannt: Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sec-Butyl, tert-Butyl, tert-Amyl, n-Hexyl, 1,1,3,3-Tetramethylbutyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl, n-Decyl, n-Undecyl, n-Dodecyl, n-Octadecyl, 3-Pentyl, 4-Heptyl, 5-Nonyl, 6-Undecyl, 7-Tridecyl, 3-Hexyl, 3-Heptyl, 3-Nonyl, 3-Undecyl, Hydroxymethyl, 2-Hydroxyethyl, Trifluormethyl, Trifluorethyl, Cyanomethyl, Methoxycarbonylmethyl, Acetoxymethyl, Benzyl, Phenyl, o-, m- oder p-Chlorphenyl, o-, m-, oder p-Methylphenyl, 1- oder 2-Naphthyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cyclododecyl, Cyclopentadecyl, Cyclohexadecyl, Cycloeicosanyl, Cycloetetracosanyl, Thienyl oder Pyranilylmethyl.

e) Die Cyanogruppe.

f) Die Gruppe der Formel —N(R₄)(R₅), worin R₄ und R₅ die unter b) angegebene Bedeutung haben. Als Beispiele seien genannt: Amino, Methylamino, Dimethylamino, Ethylamino, Diethylamino, Isopropylamino, 2-Hydroxyethylamino, 2-Hydroxypropylamino, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)amino, Cyclopentylamino, Cyclohexylamino, Cyclododecylamino, Cyclopentadecylamino, Cyclohexadecylamino, Cycloeicosanylamin, Cyclotetracosanylamin, Phenylamino, N-Methylphenylamino, Benzylamino, Dibenzylamino, Piperidyl oder Morpholyl.

g) Die Gruppe der Formel —COR₃, worin R₃ die unter a) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiele für R₃ seien genannt: Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sec-Butyl, tert-Butyl, tert-Amyl, n-Hexyl, 1,1,3,3-Tetramethylbutyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl, n-Decyl, n-Undecyl, n-Dodecyl, n-Octadecyl, 3-Pentyl, 4-Heptyl, 5-Nonyl, 6-Undecyl, 7-Tridecyl, 3-Hexyl, 3-Heptyl, 3-Nonyl, 3-Undecyl, Hydroxymethyl, 2-Hydroxyethyl, Trifluormethyl, Trifluorethyl, Cyanomethyl, Methoxycarbonylmethyl, Acetoxymethyl, Benzyl, Phenyl, o-, m- oder p-Chlorphenyl, o-, m-, oder p-Methylphenyl, 1- oder 2-Naphthyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cyclododecyl, Cyclopentadecyl, Cyclohexadecyl, Cycloeicosanyl, Cyclotetracosanyl, Thienyl, Pyranilylmethyl, Benzyl oder Furfuryl.

h) Die Gruppe der Formel —N(R₇)COR₃, worin R₃ die unter b) angegebene Bedeutung hat, R₇ Wasserstoff, Alkyl, beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sec-Butyl, n-Hexyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl, n-Decyl, n-Undecyl, n-Dodecyl, n-Octadecyl, 3-Pentyl, 4-Heptyl, 5-Nonyl, 6-Undecyl, 7-Tridecyl, 3-Hexyl, 3-Heptyl, 3-Nonyl, 3-Undecyl, Hydroxymethyl, 2-Hydroxyethyl, Cyanomethyl, Methoxycarbonylmethyl, Acetoxymethyl, Benzyl, Phenyl, insbesondere unsubstituiertes oder durch Halogen, Alkyl oder —O-Alkyl substituiertes Phenyl, beispielsweise o-, m- oder p-Chlorphenyl, o-, m-, oder p-Methylphenyl, 1- oder 2-Naphthyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cyclododecyl, Cyclopentadecyl, Cyclohexadecyl, Cycloeicosanyl, Cyclotetracosanyl, Thienyl, Pyranilylmethyl, Benzyl oder Furfuryl. In den Definitionen von R₇ vorkommendes Alkyl kann z. B. eine der unter b) bevorzugt angegebene Anzahl C-Atome haben. Als Beispiel seien genannt: Acetylamin, Propionylamin, Butyrylamin, Benzoylamin, p-Chlorbenzoylamin, p-Methylbenzoylamin, N-Methylacetamin, N-Methylbenzylamin, N-Succinimido, N-Phthalimido oder N-(4-Aminolphthalimido).

i) Die Gruppe der Formel —N(R₆)COOR₃, worin R₃ und R₆ die unter b) bzw. c) angegebene Bedeutung haben. Als Beispiele seien die Gruppen —NHCOOCH₃, —NHCOOC₂H₅, oder —NHCOOC₆H₅ genannt.

j) Die Gruppe der Formel —N(R₆)CON(R₄)(R₅), worin R₄, R₅ und R₆ die unter b) bzw. c) angegebene Bedeutung haben. Als Beispiele seien genannt: Ureido, N-Methylureido, N-Phenylureido, oder N,N'-2',4'-Dimethylphenylureido.

k) Die Gruppe der Formel —NHSO₂R₃, worin R₃ die unter b) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiele seien genannt: Methylsulfonylamin, Phenylsulfonylamin, p-Tolylsulfonylamin oder 2-Naphthylsulfonylamin.

l) Die Gruppen der Formel —SO₂R₃ oder —SOR₃, worin R₃ die unter b) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiele seien genannt: Methylsulfonyl, Ethylsulfonyl, Phenylsulfonyl, 2-Naphthylsulfonyl, Phenylsulfoxidyl.

m) Die Gruppe der Formel —SO₂OR₃, worin R₃ die unter b) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiele für R₃ seien genannt: Methyl, Ethyl, Phenyl, o-, m-, oder p-Chlorphenyl, o-, m-, oder p-Methylphenyl, 1- oder 2-Naphthyl.

n) Die Gruppe der Formel —CON(R₄)(R₅), worin R₄ und R₅ die unter b) angegebene Bedeutung haben.

Als Beispiele seien genannt : Carbamoyl, N-Methylcarbamoyl, N-Ethylcarbamoyl, N-Phenylcarbamoyl, N,N-Dimethylcarbamoyl, N-Methyl-N-phenylcarbamoyl, N-1-Naphthylcarbamoyl oder N-Pi-perdylcarbamoyl.

o) Die Gruppe der Formel $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}_4)(\text{R}_5)$, worin R_4 und R_5 die unter b) angegebene Bedeutung haben. Als Beispiele seien genannt : Sulfamoyl, N-Methylsulfamoyl, N-Ethylsulfamoyl, N-Phenylsulfamoyl, N-Methyl-N-phenylsulfamoyl oder N-Morpholysulfamoyl.

p) Die Gruppe der Formel $-\text{N}=\text{N}-\text{R}_8$, worin R_8 den Rest einer Kupplungskomponente oder einen gegebenenfalls durch Halogen, Alkyl oder $-\text{O}$ -Alkyl substituierten Phenylrest bedeutet. In den Definitionen von R_8 vorkommendes Alkyl kann z. B. eine der unter b) als bevorzugt angegebene Anzahl C-Atome haben. Als Beispiele für R_8 seien genannt : die Acetoacetarylid-, Pyrazolyl-, Pyridonyl-, o-, p-Hydroxyphenyl-, o-Hydroxynaphthyl-, p-Aminophenyl- oder p-N,N-Dimethylaminophenyl-Reste.

q) Die Gruppe der Formel $-\text{OCOR}_3$, worin R_3 die unter b) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiele für R_3 seien genannt : Methyl, Ethyl, Phenyl, o-, m- oder p-Chlorphenyl.

r) Die Gruppe der Formel $-\text{OCONHR}_3$, worin R_3 die unter a) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiel für R_3 seien genannt : Methyl, Ethyl, Phenyl, o-, m-, oder p-Chlorphenyl.

R_1 und R_2 können Wasserstoff und ein bis vier der folgenden Reste bedeuten :

a) Halogenatome, beispielsweise Chlor, Brom, Jod oder Fluor.

b) Verzweigte oder unverzweigte Alkylgruppen mit vorzugsweise 1 bis 18, insbesondere 1 bis 12, vor allem 1 bis 8 und besonders bevorzugt 1 bis 4 C-Atomen. Diese Alkylgruppen können nicht-wasserlöslich machende Substituenten aufweisen, wie beispielsweise Fluor, Hydroxy, Cyano, $-\text{OCOR}_3$, $-\text{OR}_6$, $-\text{OCOR}_3$, $-\text{CON}(\text{R}_4)(\text{R}_5)$ oder $-\text{OCONHR}_3$, worin R_3 Alkyl, Aryl wie Naphthyl, oder unsubstituiertes oder durch Halogen, Alkyl, oder $-\text{O}$ -Alkyl substituiertes Benzyl oder einen heterocyclischen Rest, R_4 und R_5 Wasserstoff, unsubstituiertes oder durch Cyano oder Hydroxy substituiertes Alkyl, C_3 -bis C_{24} -Cycloalkyl, bevorzugt C_5 -, C_6 -, C_{12} -, C_{15} -, C_{16} -, C_{20} - und C_{24} -Cycloalkyl, Aryl oder Heteroaryl, insbesondere unsubstituiertes oder durch Halogen, Alkyl oder $-\text{O}$ -Alkyl substituiertes Phenyl bedeuten, oder worin R_4 und R_5 zusammen mit dem anderen Rest R_2 einen 5-6gliedrigen Ring oder auch Heteroring bilden, wie beispielsweise einen Pyridin-, Pyrrol-, Furan- oder Pyranring. Weitere mögliche Substituenten an den Alkylgruppen sind mono- oder dialkylierte Aminogruppen, Arylreste, wie Naphthyl oder insbesondere unsubstituierte oder durch Halogen, Alkyl oder $-\text{O}$ -Alkyl substituiertes Phenyl, oder ferner heterocyclische aromatische Reste, wie z. B. die 2-Thienyl, 2-Benzoxazolyl-, 2-Benzthiazolyl-, 2-Benzimidazolyl-, 6-Benzimidazolonyl-, 2-, 3- oder 4-Pyridinyl-, 2-, 4-, oder 6-Chinoly- oder 1-, 3-, 4-, 6-, oder 8-Isochinolyreste.

Enthalten die unter b) genannten Substituenten ihrerseits wieder Alkyl, so kann dieses Alkyl verzweigt oder unverzweigt sein und vorzugsweise 1 bis 18, insbesondere 1 bis 12, vor allem 1 bis 8 und besonders bevorzugt 1 bis 4 C-Atome enthalten.

Beispiele von unsubstituierten Alkylgruppen sind Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sec-Butyl, tert-Butyl, tert-Amyl, n-Hexyl, 1,1,3,3-Tetramethylbutyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl, n-Decyl, n-Undecyl, n-Dodecyl, n-Octadecyl, 3-Pentyl, 4-Heptyl, 5-Nonyl, 6-Undecyl, 7-Tridecyl, 3-Hexyl, 3-Heptyl, 3-Nonyl, 3-Undecyl, Hydroxymethyl, 2-Hydroxyethyl, Trifluormethyl, Trifluorethyl, Cyanomethyl, Methoxycarbonylmethyl, Acetoxymethyl oder Benzyl.

c) Die Gruppe $-\text{OR}_6$, worin R_6 Wasserstoff, Alkyl, Aryl, beispielsweise Naphthyl oder insbesondere unsubstituiertes Phenyl, C_3 bis C_{24} -Cycloalkyl, bevorzugt C_5 -, C_6 -, C_{12} -, C_{15} -, C_{16} -, C_{20} -, und C_{24} -Cycloalkyl, Aryl oder Heteroaryl, insbesondere unsubstituiertes oder durch Halogen, Alkyl oder $-\text{O}$ -Alkyl substituiertes Phenyl bedeuten. In den Definitionen von R_6 vorkommendes Alkyl kann z. B. eine der unter b) als bevorzugt angegebene Anzahl an C-Atome haben. Als Beispiele von R_6 seien genannt : Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sec-Butyl, tert-Butyl, tert-Amyl, n-Hexyl, 1,1,3,3-Tetramethylbutyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl, n-Decyl, n-Undecyl, n-Dodecyl, n-Octadecyl, 3-Pentyl, 4-Heptyl, 5-Nonyl, 6-Undecyl, 7-Tridecyl, 3-Hexyl, 3-Heptyl, 3-Nonyl, 3-Undecyl, Hydroxymethyl, 2-Hydroxyethyl, Trifluormethyl, Trifluorethyl, Cyanomethyl, Methoxycarbonylmethyl, Acetoxymethyl, Benzyl, Phenyl, o-, m- oder p-Chlorphenyl, o-, m-, oder p-Methylphenyl, 1- oder 2-Naphthyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cyclododecyl, Cyclopentadecyl, Cyclohexadecyl, Cycloeicosanyl, cloeicosanyl, Cyclotetracosanyl, Thienyl oder Pyranylmethyl.

e) Die Cyanogruppe.

f) Die Gruppe der Formel $-\text{N}(\text{R}_4)(\text{R}_5)$, worin R_4 und R_5 die unter b) angegebene Bedeutung haben. Als Beispiele seien genannt : Amino, Methylamino, Dimethylamino, Ethylamino, Diethylamino, Isopropylamino, 2-Hydroxyethylamino, 2-Hydroxypropylamino, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)amino, Cyclopentylamino, Cyclohexylamino, Cyclododecylamino, Cyclopentadecylamino, Cyclohexadecylamino, Cycloeicosanylamino, Cyclotetracosanylamino, Phenylamino, N-Methylphenylamino, Benzylamino, Dibenzylamino, Piperidyl oder Morpholyl.

g) Die Gruppe der Formel $-\text{COR}_3$, worin R_3 die unter a) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiele für R_3 seien genannt : Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sec-Butyl, tert-Butyl, tert-Amyl, n-Hexyl, 1,1,3,3-Tetramethylbutyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl, n-Decyl, n-Undecyl, n-Dodecyl, n-Octadecyl, 3-Pentyl, 4-Heptyl, 5-Nonyl, 6-Undecyl, 7-Tridecyl, 3-Hexyl, 3-Heptyl, 3-Nonyl, 3-Undecyl, Hydroxymethyl, 2-Hydroxyethyl, Trifluormethyl, Trifluorethyl, Cyanomethyl, Methoxycarbonylmethyl, Acetoxymethyl, Benzyl, Phenyl, o-, m- oder p-Chlorphenyl, o-, m- oder p-Methylphenyl, 1- oder 2-Naphthyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cyclododecyl, Cyclopentadecyl, Cyclohexadecyl, Cycloeicosanyl, Cyclotetracosanyl, Thienyl, Pyranylmethyl, Benzyl oder Furfuryl.

h) Die Gruppe der Formel $-\text{N}(\text{R}^7)\text{COR}_3$, worin R_3 die unter b) angegebene Bedeutung hat, R^7 Wasser-

- stoff, Alkyl, beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sec-Butyl, n-Hexyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl, n-Decyl, n-Undecyl, n-Dodecyl, n-Octadecyl, 3-Pentyl, 4-Heptyl, 5-Nonyl, 6-Undecyl, 7-Tridecyl, 3-Hexyl, 3-Heptyl, 3-Nonyl, 3-Undecyl, Hydroxymethyl, 2-Hydroxyethyl, Cyanomethyl, Methoxycarbonylmethyl, Acetoxymethyl, Benzyl, Phenyl, insbesondere unsubstituiertes oder durch Halogen, Alkyl oder -O-Alkyl substituiertes Phenyl, beispielsweise o-, m- oder p-Chlorphenyl, o-, m- oder p-Methylphenyl, 1- oder 2-Naphthyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cyclododecyl, Cyclopentadecyl, Cyclohexadecyl, Cycloeicosanyl, Cyclotetracosanyl, Thienyl, Pyranilylmethyl, Benzyl oder Furfuryl. In den Definitionen von R_7 vorkommendes Alkyl kann z. B. eine der unter b) bevorzugt angegebene Anzahl C-Atome haben. Als Beispiel seien genannt: Acetylamino, Propionylamino, Butyrylamino, Benzoylamino, p-Chlorbenzoylamino, p-Methylbenzoylamino, N-Methylacetamino, N-Methylbenzoylamino, N-Succinimido, N-Phthalimido oder N-(4-Amino)phthalimido.
- i) Die Gruppe der Formel $-N(R_6)COOR_3$, worin R_3 und R_6 die unter b) bzw. c) angegebene Bedeutung haben. Als Beispiele seien die Gruppen $-NHCOOCH_3$, $-NHCOOC_2H_5$ oder $-NHCOOC_6H_5$ genannt.
- j) Die Gruppe der Formel $-N(R_6)CON(R_4)(R_5)$, worin R_4 , R_5 und R_6 die unter b) bzw. c) angegebene Bedeutung haben. Als Beispiele seien genannt: Ureido, N-Methylureido, N-Phenylureido oder N,N'-2',4'-Dimethylphenylureido.
- k) Die Gruppe der Formel $-NHSO_2R_3$, worin R_3 die unter b) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiele seien genannt: Methylsulfonylamino, Phenylsulfonylamino, p-Tolylsulfonylamino oder 2-Naphthylsulfonylamino.
- l) Die Gruppen der Formel $-SO_2R_3$ oder $-SOR_3$, worin R_3 die unter b) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiele seien genannt: Methylsulfonyl, Ethylsulfonyl, Phenylsulfonyl, 2-Naphthylsulfonyl, Phenylsulfoxidyl.
- m) Die Gruppe der Formel $-SO_2OR_3$, worin R_3 die unter b) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiele für R_3 seien genannt: Methyl, Ethyl, Phenyl, o-, m- oder p-Chlorphenyl, o-, m- oder o-Methylphenyl, 1- oder 2-Naphthyl.
- n) Die Gruppe der Formel $-CON(R_4)(R_5)$, worin R_4 und R_5 die unter b) angegebene Bedeutung haben. Als Beispiele seien genannt: Carbamoyl, N-Methylcarbamoyl, N-Ethylcarbamoyl, N-Phenylcarbamoyl, N,N-Dimethylcarbamoyl, N-Methyl-N-phenylcarbamoyl, N-1-Naphthylcarbamoyl oder N-Piperdylcarbamoyl.
- o) Die Gruppe der Formel $-SO_2N(R_4)(R_5)$, worin R_4 und R_5 die unter b) angegebene Bedeutung haben. Als Beispiele seien genannt: Sulfamoyl, N-Methylsulfamoyl, N-Ethylsulfamoyl, N-Phenylsulfamoyl, N-Methyl-N-phenylsulfamoyl oder N-Morpholysulfamoyl.
- p) Die Gruppe der Formel $-N=N-R_8$ den Rest eine Kupplungskomponente oder einen gegebenenfalls durch Halogen, Alkyl oder -O-Alkyl substituierten Phenylrest bedeutet. In den Definitionen von R_8 vorkommendes Alkyl kann z. B. eine der unter b) als bevorzugt angegebene Anzahl C-Atome haben. Als Beispiele für R_8 seien genannt: die Acetoacetyl-, Pyrazolyl-, Pyridonyl-, o-, p-Hydroxyphenyl-, o-Hydroxynaphthyl-, p-Aminophenyl- oder p-N,N-Dimethylaminophenyl-Reste.
- q) Die Gruppe der Formel $-OCOR_3$, worin R_3 die unter b) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiele für R_3 seien genannt: Methyl, Ethyl, Phenyl, o-, m- oder p-Chlorphenyl.
- r) Die Gruppe der Formel $-OCONHR_3$, worin R_3 die unter a) angegebene Bedeutung hat. Als Beispiel für R_3 seien genannt: Methyl, Ethyl, Phenyl, o-, m- oder p-Chlorphenyl.
11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß 1 bis 200 SATA-Einheiten auf einen Antikörper bei 1 bis 1000 Maleinimid-Funktionen auf der Oberfläche des Liposoms verwendet werden. Bevorzugt ist ein Verhältnis 12 SATA: 1 Antikörper: 40 Maleinimid-Resten.
12. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß 1 bis 200 SPDP-Einheiten auf einen Antikörper bei 1 bis 1000 Maleinimid-Spacergruppen auf der Oberfläche des Liposoms verwendet werden. Bevorzugt ist ein Verhältnis 24 SPDP: 1 Antikörper: 40 Maleinimid-Resten.
13. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß 1 bis 50 Antikörper mit einem Liposom verknüpft werden. Bevorzugt sind 1 bis 5 Antikörper.
14. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß 1 bis 10^8 Immunoliposomen pro Ziel-Zelle verwendet werden, bevorzugt sind 100 bis 10^7 , stärker bevorzugt sind 10^5 bis 10^7 , am meisten bevorzugt sind 10^6 bis $4 \cdot 10^6$ Immunoliposomen pro Ziel-Zelle.
15. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Fluoreszenzfarbstoff im molaren Verhältnis zum Sojabohnenöl-Phosphatidylcholin von 0.00001 bis 0.1 zu 1, bevorzugt von 0.001 bis 0.01 zu 1, am meisten bevorzugt von 0.006 : 1, eingesetzt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß zur Detektion des Fluoreszenzfarbstoffs Licht mit hoher Intensität verwendet wird.
17. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die mit den Antikörpern verknüpften Liposomen bei 4°C gelagert werden.
18. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Verknüpfung von Antikörpern mit SATA oder SPDP bei Temperaturen von 4 bis 40°C, bevorzugt 20 bis 25°C während 1 Minute bis 10 Stunden, bevorzugt 1 Stunde, vorgenommen wird und anschließend überschüssiges Reagenz bei 0 bis 10°C, bevorzugt bei 4°C, durch Dialyse während 2 bis 500 Stunden, bevorzugt 24 Stunden, entfernt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die eigentliche Kupplung mit den Liposomen nach einer Voraktivierung mit Hydroxylamin in einem Phosphatpuffer bei pH 6.0 durch Inkubation bei 25°C unter nachfolgender Behandlung mit N-Methylmaleinimid erfolgt.
20. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Immunoliposomen von den nicht

umgesetzten Antikörper mit der Ultrazentrifuge in einem Dichtegradienten oder chromatographisch abgetrennt werden.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

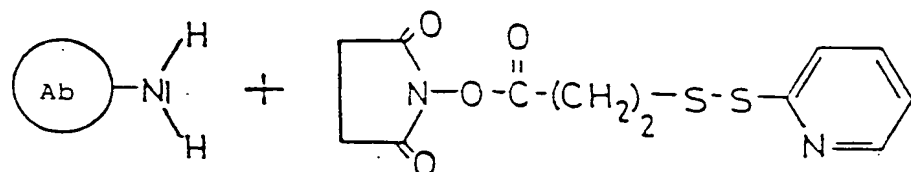
50

55

60

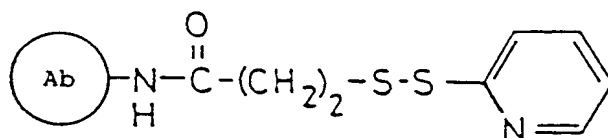
65

Abb. 1a



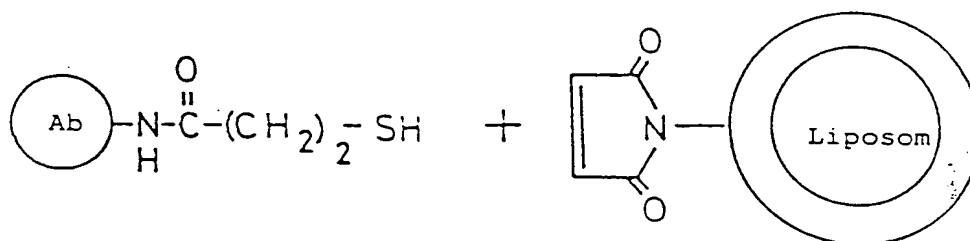
SPDP

pH 7.5, 60 min, Dialyse



DTT, pH 4.5, 60 min

Säulenchromatographie



pH 6.0, 2-4 h

HPLC oder Metrizamid-Gradient

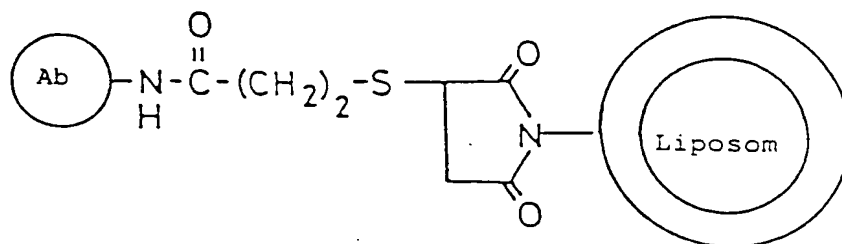


Abb. 1b

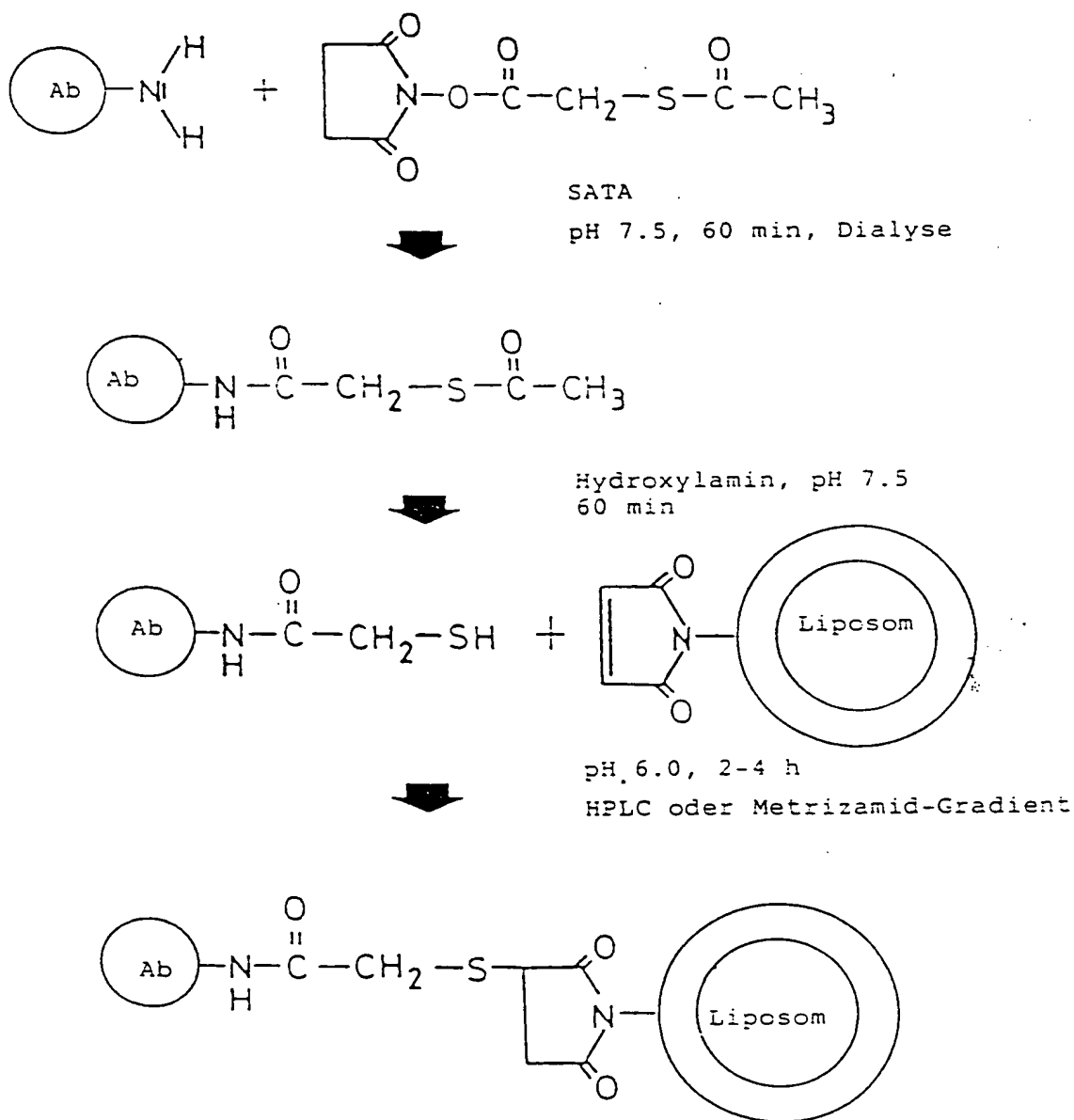


Abb. 1c

Mischung: N^4 -Oleoyl-ara C + Stearylamin + PE-Biotin
+ Cholesterol + Sojabohnenöl PhosphatidylCholin

Detergens-Dialyse

Biotin-Liposom



1. Avidin

2. Ultrogel AcA 22-Säule

Biotin-Avidin-Liposom

1. (Biotin)_n-IgG

2. Ultrogel AcA 22-Säule

Biotin-Avidin-(Biotin)_n-IgG-Liposom

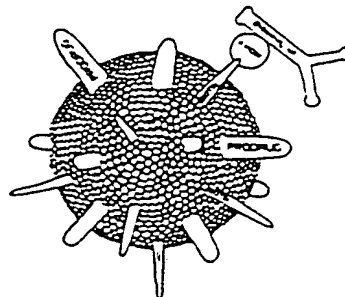
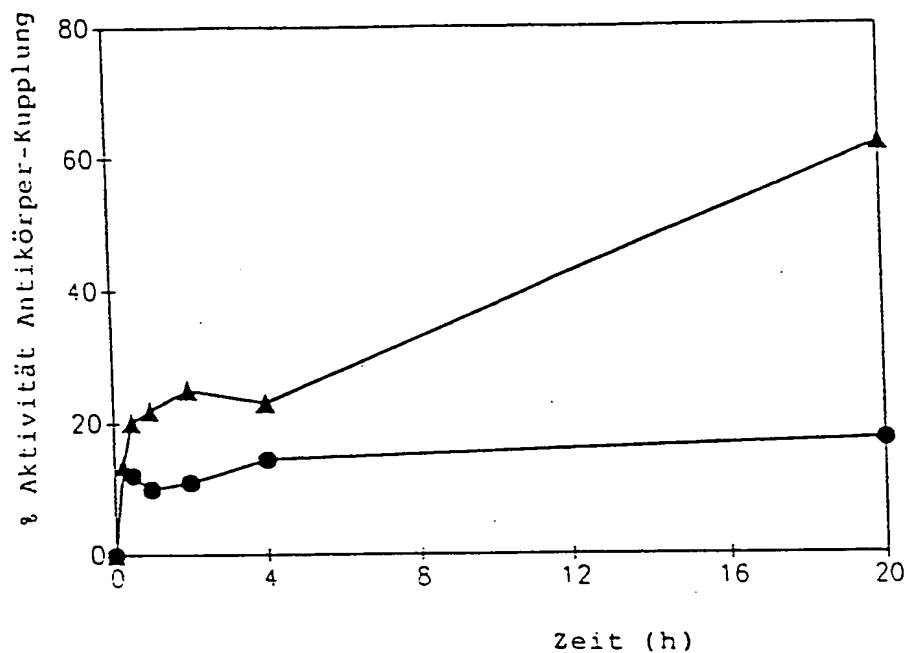


Abb. 2

a)



b)

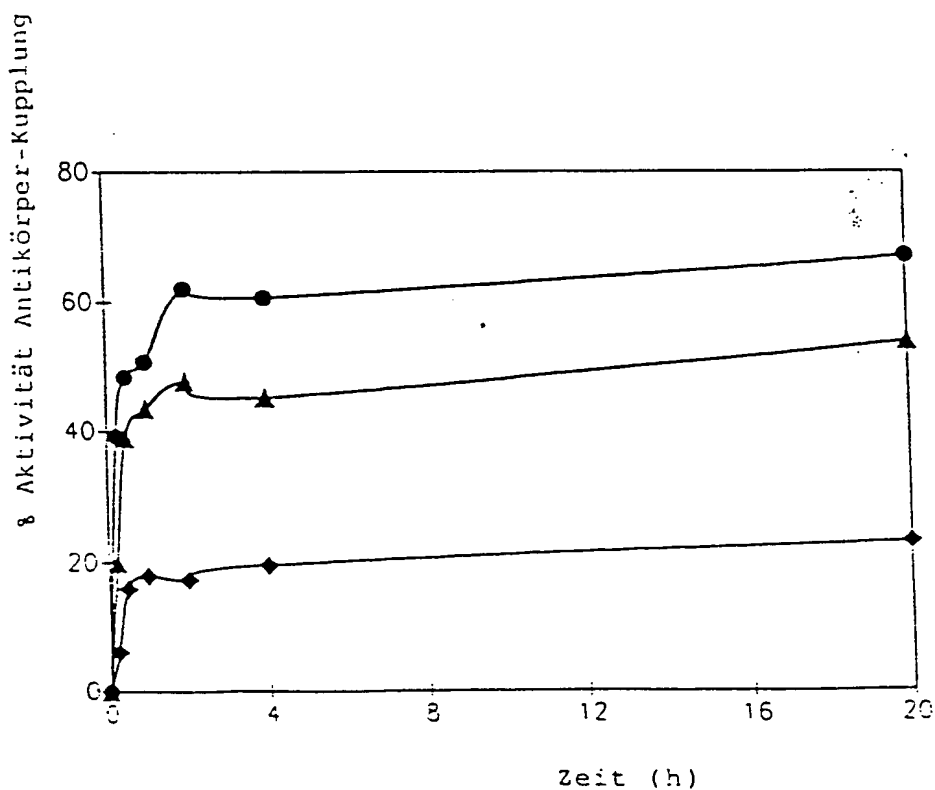


Abb. 3

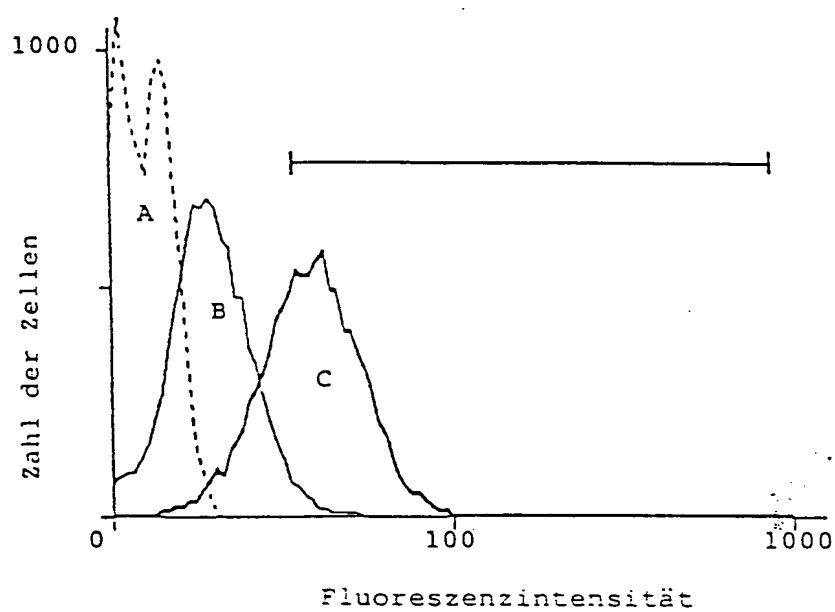


Abb. 4

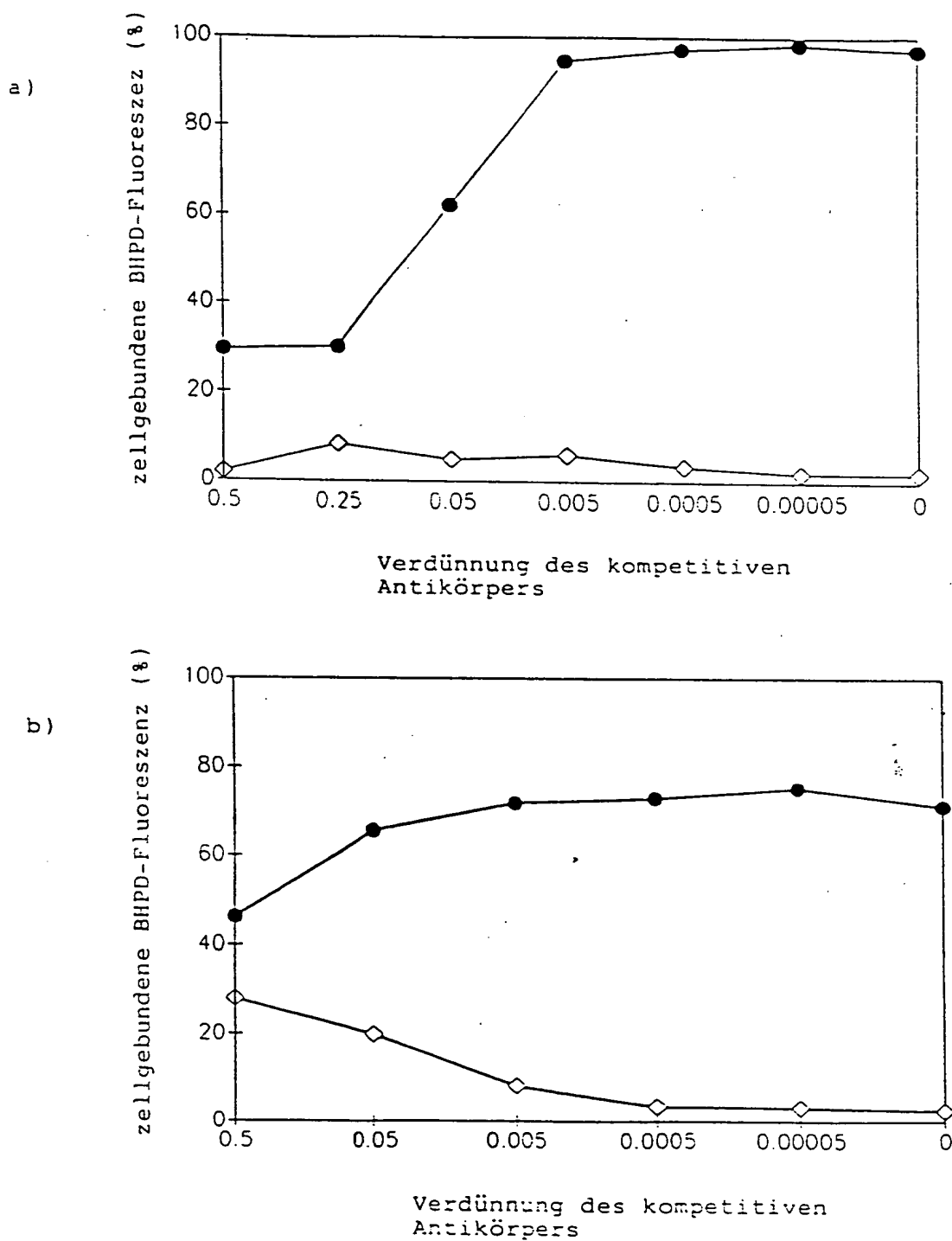
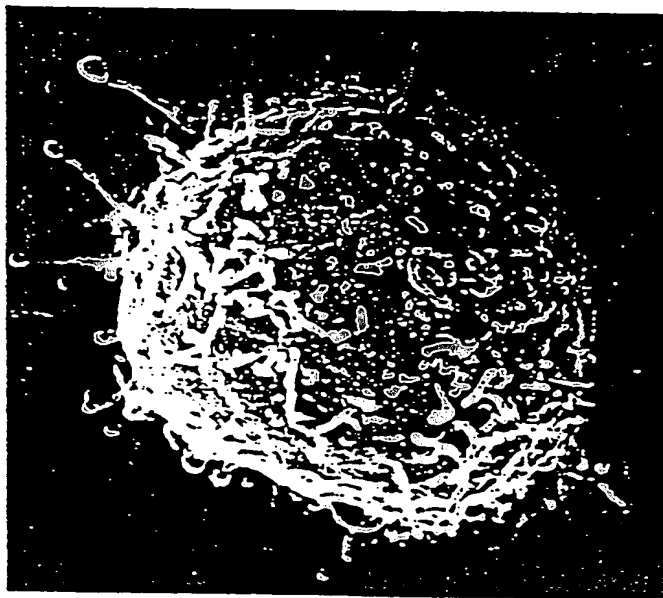
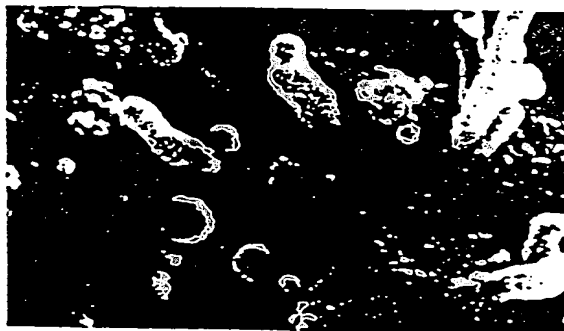


Abb. 5

a)



b)



c)

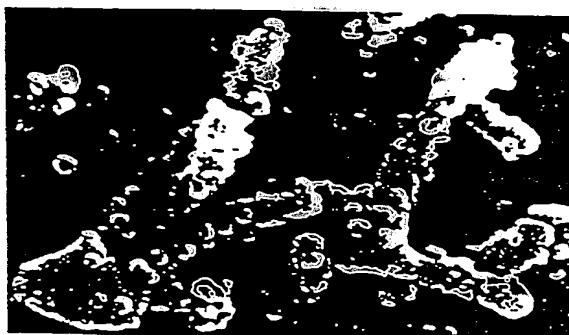
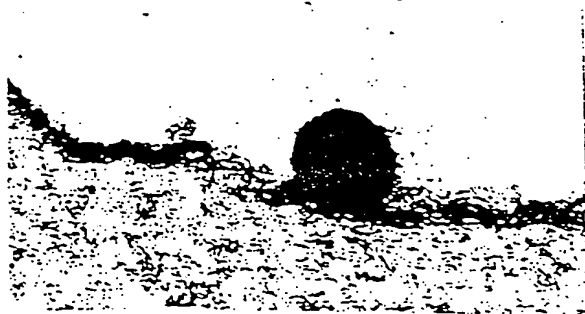


Abb. 6

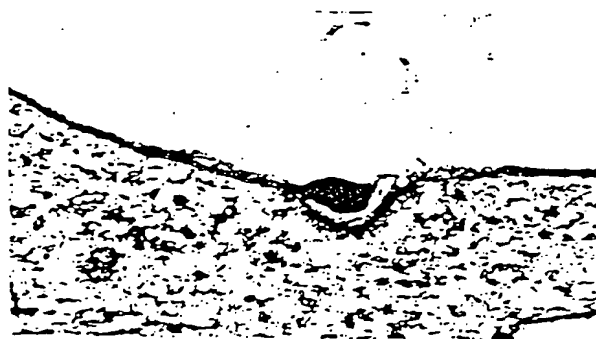
a)



b)



c)



THIS PAGE BLANK (USPTO)